人乳头瘤病毒 16 型L1 基因在毕赤酵母中表达的影响因素分析

杨旭[1,2,3,4]，黄惟巍[1,2,3,4]，姚宇峰[1,2,3,4]刘存宝[1,2,3,4]，孙文佳[1,2,3,4]，白红妹[1,2,3,4]，马雁冰*[1,2,3,4]

1.中国医学科学院 北京协和医学院 医学生物学研究所,云南 昆明 650118；2. 云南省重大传染病疫苗研发重点实验室，云南 昆明 650118；3. 云南省重大传染病疫苗工程技术研究中心，云南 昆明 650118；4. 云南省重大传染病疫苗研发国家地方联合工程研究中心 云南 昆明 650118

摘要 目的： 优化人乳头瘤病毒 16 型主要衣壳蛋白 L1（human papillomavirus type 16 major capsid protein L1，HPV16L1）在毕赤酵母中的表达，并考察可能的影响因素。方法：四个不同序列特征的 HPV16L1 基因 M16、Y16、P16、W16（其中，M16 和 Y16 按酵母密码子优化，P16 为哺乳动物细胞密码子优化，而 W16 为野生型序列）分别克隆于毕赤酵母表达质粒 pPink™-HC（高基因拷贝菌落筛选）和 pPink™-LC（低基因拷贝菌落筛选），并转化不同蛋白酶缺陷的宿主菌。甲醇诱导 24 小时后，取菌体样品经 Western Blot 分析 L1 蛋白的表达。结果：M16 显示了最高的表达水平，其次是 Y16 与 P16，而 W16 几乎无表达。基因序列密码子应用特征分析显示，四个基因的密码子适应指数从高到低依次为 Y16、M16、W16 和 P16。通过自由能和 GC 含量分析四个序列的 mRNA 二级结构，Y16 为－409.40 kcal/mol 和 43.85%；M16 为－451.50 kcal/mol 和 47.83%；P 16 为－606.50 kcal/mol and 64.10%；W16 为－384.70 kcal/mol and 38.01% 。蛋白酶缺陷菌株 L1 表达高于野生型菌株，质粒 pPink™-HC 与 pPink™-LC 介导的表达无明显区别。结论：密码子优化操作显著改善了 HPV16L1 在毕赤酵母中的表达，但表达水平与密码子利用优劣并不完全对应，提示密码子优化仅是部分原因，而 mRNA 结构与稳定性变化值得探讨。蛋白酶缺陷菌株提高了 HPV16L1 蛋白的稳定性，显著影响了表达水平。在本研究中，基因剂量对 HPV16L1 的表达未产生明显影响。

关键词 表达；重组；人乳头瘤病毒 16 主要衣壳蛋白 L1；毕赤酵母

通讯作者：马雁冰，Email：may@imbcams.com.cn
云南省科技计划重点项目（No. 2016FA049）、北京协和医学院病原生物研究所基本科研业务专项费项目（No. 2014IPB107）、云南省应用基础研究面上项目（2010ZC232）;、中央高校基本科研业务费(2012N08)；

甲醇营养型毕赤酵母被广泛应用于重组异源蛋白的表达[1]。作为单细胞真核微生物，它具有真核表达系统的诸多优势，如能实现外源蛋白的分泌表达，具有真核表达系统的翻译后修饰如糖基化和磷酸化等功能，能在基本培养基上快速生长，而且无潜在内毒素和病毒脱氧核糖核酸的污染[2-4]。此外，毕赤酵母能实现高密度生长和发酵，因而适合于大规模的工业化生产[3]。然而，并不是所有的外源基因都能在毕赤酵母成功表达，通常需要对表达进行优化从而提升外源基因在毕赤酵母中的表达水平[1]。在这些优化策略中，密码子优化是最常采用的方法之一。密码子优化的方法基于不同生物对各种密码子使用频率的差异对外源基因进行优化，高表达蛋白质中的高频率密码子相应的 tRNA 的丰度更高，这种对高频率密码子的偏爱使得蛋白的合成速率更高[5]。有研究报道通过密码子优化方法实现了人乳头瘤病毒主要衣壳蛋白 L1 的高效表达[6-8]。此外，通过基因重组方法增加基因剂量从而实现基因的高拷贝和通过蛋白酶缺陷菌株提高蛋白质的稳定性也是提高蛋白表达的常用方法[9]。在本研究采取了多策略的优化方法以期实现 HPV16L1 在毕赤酵母中的高效表达。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1 质粒、菌株与宿主菌　真核毕赤酵母表达系统 PichiaPink^{TM} 包括表达质粒 pPink HC（高拷贝）、pPink LC（低拷贝）、表达用宿主菌 strains 1～4 购自美国 Invitrogen 公司 (*Invitrogen Inc*. 5791 Van Alen Way Carlsbad,California 92008,U.S.A),根据酵母密码子偏好优化的 HPV 16 L1 全长基因序列 M16、Y16 由生工生物工程（上海）股份有限公司合成，并构建质粒 PUC57；哺乳动物细胞密码子偏好优化的 HPV 16 L1 基因 P16 由质粒 p16shell (由美国国立癌症研究所 Dr. Schiller 提供)通过 PCR 扩增获得，携带野生型 HPV16 L1 基因的序列 W16 由本室（中国医学科学院医学生物学研究所分子免疫实验室）保存。大肠埃希菌（*E.coli*）DH5α购自宝生物工程（大连）有限公司。

1.1.2　主要试剂　DNA marker、Taq 多聚酶、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶购自大连 TaKaRa 公司；质粒提取试剂盒和 DNA 凝胶回收试剂盒购自北京天根生化科技有限公司；酵母提取物和胰蛋白胨均购自英国 OXOID 公司；鼠抗 HPV 16

L1 单克隆抗体及 HRP 标记兔抗鼠 IgG 购自美国 Santa Cluz 公司；显色底物 Pierce ECL 购自美国 Thermo 公司；其他试剂均为国产分析纯。酵母生长培养用甘油复合培养基 BMGY 和诱导用甲醇复合培养基 BMMY 由本实验室自行配制，培养基配方中均分别含 1%的酵母提取物，2%蛋白胨，100mM 磷酸盐、1.34% YNB（酵母氮碱），4×10^{-4}%生物素，BMGY 中含 1%甘油，BMMY 中含 0.5%甲醇用于蛋白的诱导。

1.2 方法

1.2.1 HPV16L1 不同基因序列的设计合成和重组质粒的构建

根据 Genebank 中登录的氨基酸序列并基于毕赤酵母密码子使用频率设计合成 M16[UniProtKB/Swiss-Prot: P03101.2]和 Y16 [NC_001526.2]的基因序列，设计过程中避免稀有密码子（氨基酸同义密码子的使用频率<0.1）和构建过程中使用的内切酶位点，M16 和 Y16 的区别在于 M16 的密码子分布较为均衡，选用较偏好的密码子，而 Y16 倾向于挑选同义密码子中使用频率最高的那个密码子，全基因序列由上海生物工程有限公司合成，同时合成引物序列，见表 1。以携带 HPV 16L1 不同序列基因的质粒 DNA 为模板，对 HPV16 L1 基因进行扩增。反应条件为：95 ℃ 30 s；54 ℃ 30 s，72 ℃ 90 s，共 30 个循环。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定。表达载体 pPink HC 或 LC 经 *Bsa* I/*EcoR* I/ *Sph* I 和 *Kpn* I 酶切后回收载体片段，和经同样双酶切处理的 PCR 扩增产物在 T_4DNA 连接酶作用下 16℃连接过夜，转化 DH5a 感受态细胞，经 AMP^+LB 琼脂平板筛选阳性克隆并测序鉴定。

表 1. PCR 引物序列

Table 1. Primers used for the amplification of different versions of HPV16 L1 gene sequences

	引物序列（5′ — 3′）	酶切位点
W16HC/LC-F	AA**GGTCTC**GAATTCGAAACGATGTCTCTTTGGCTGCCTAGTGA	*Bsa* I
W16HC/LC -R	GG**GGTACC**TTACAGCTTACGTTTTTTGCGTTTA	*Kpn* I
P16HC/LC- F	CG**GAATTC**GAAACGATGAGCCTGTGGCTGC	*EcoR* I
P16HC/LC- R	GG**GGTACC**TCACAGCTTCCTCTTCTTCC	*Kpn* I
M16HC/LC-F	CG**GAATTC**GAAACGATGTCATTGTGGCTACCTTCT	*EcoR* I
M16HC/LC-R	GT**GCATGC**TTACAGTTTCCTCTGTTTACGTTT	*Sph* I
Y16HC/LC-F	CG**GAATTC**GAAACGATGTCTTTGTGGTTGCCATCT	*EcoR* I
Y16HC/LC-R	GG**GGTACC**TTACAACTTTCTCTTCTTTCTCTTAGCA	*Kpn* I

1.2.2 HPV16L1 重组质粒转化 PichiaPink™毕赤酵母细胞和表达

不同序列特征 HPV16L1 基因（M16、Y16、P16 和 W16）构建 pPink HC 和 LC 表达载体，经测序和酶切鉴定正确的重组质粒电转化 PichiaPink™ 不同菌株。酵母菌株接种于 5ml YPD 培养基过夜培养，然后将过夜培养物转接至含 500mlYPD 的 2L 三角烧瓶中，30℃280 rpm 培养至菌体 OD_{600}=1.3～1.5，4℃ 1,500 g 离心 5 分钟分离菌体，将菌体重悬于冰预冷的灭菌双蒸水中，按上述步骤离心菌体沉淀，再将菌体重悬于冰预冷的灭菌双蒸水中，同样条件离心后用 1M 冰预冷的山梨醇重悬菌体,再次同样条件离心，菌体用 1.5ml 冰预冷的山梨醇重悬，即为酵母感受态细胞。重组质粒在电转化前用 Afl II 内切酶进行线性化处理，取 5～20μg 线性化重组质粒，加入 80μl 上述制备好的酵母感受态细胞，将重组质粒和感受态混悬液加入预冷的 2mm 电转杯中，在冰上放置 5 分钟，将电转杯放入电转仪(GenePulser Xecll, Bio-Rad)，调整参数为电压 1.5 kV/cm，电容 50 μF,电阻 129Ω，电击时间为±5 msec。静置 1hr 后将内容物涂布 ade^{-}平板，于 30℃培养 4～7 天进行阳性克隆筛选。随机挑选平板上的白色阳性克隆接种至 25mlBMGY 培养基中，于 30℃280 rpm 培养至 OD_{600}= 3.0～3.5，1500 g 离心 5 分钟，将菌体沉淀重悬于 25ml BMMY 中，于 30℃ 280 rpm 诱导 24hr，以未诱导的含表达载体的菌为阴性对照。

1.2.3 重组蛋白表达的 Western blot 分析

诱导 24hr 后收获菌体离心，样品经 12％的 SDS-PAGE 分离后，经 Trans-blot®SD（Bio-Rad）恒流 150mA 1h 转移至 0.45μm 的 PVDF 膜上，以含 5％脱脂奶粉的 TBST(20 mM Tris·HCl, 0.05% Tween 20, pH 7.2)于室温封闭 2 h；加入 1:500 用 TBST 稀释的鼠抗 HPV16 L1 单克隆抗体(sc-2005, Santa Cruz)，室温孵育 2h；TBST 洗涤 3 次后，加入 1:10000 用 TBST 稀释的 HRP 标记的兔抗鼠 IgG，室温孵育 1 h；TBST 洗涤 3 次后，将洗涤后的 PVDF 膜用 ECL(Pierce®ECL, Thermo, USA)显色底物浸染 5min，X 光底片曝光分析结果。

1.2.4 不同 HPV16L1 基因序列密码子分布情况和序列特征分析

为了分析基因序列密码子不同分布情况和蛋白表达水平之间的关系，通过在线网站(http://www.genscript.com/cgi-bin/tools/codon_freq_table)引用毕赤酵母密码子的使用频率表，

并通过(http://www.genscript.com/cgi-bin/tools/rare_codon_analysis).分析四个HPV16L1基因序列M16、Y16、P16、W16密码子在毕赤酵母中的使用分布情况，统计结果见图3。通过(http://rna.tbi.univie.ac.at/)预测mRNA折叠自由能、密码子适应指数CAI（codon adaptation index）并进行GC含量分析，结果见表2。

2 结果与分析

2.1 HPV16L1 重组质粒的PCR及酶切鉴定

构建后重组质粒进行PCR鉴定，产物经1%琼脂糖凝胶电泳，在分子量约1500bp处得到与预期分子量大小相符的DNA条带。各重组质粒经双酶切鉴定，目的条带位于约1500bp左右，与预期相符。

2.2 不同密码子优化HPV16L1基因序列在毕赤酵母中的表达

2.2.1 HPV16L1 基因序列 M16、Y16、P16、W16 在 pPink HC 中的表达

HPV16 L1 基因序列M16、Y16、P16、W16分别构建表达载体pPink HC和LC，转化Strain1，蛋白诱导表达24hr后收集样品进行Western blot 检测，结果显示，毕赤酵母密码子偏好优化的基因序列M16和Y16以及哺乳动物细胞密码子优化序列P16都在Stain 1中获得了有效表达（图1A和1B），目的蛋白分子量在55KD左右，在30-50KD之间也出现反应条带，可能为降解蛋白，因为在无目的基因的宿主菌对照中该分子质量之间并无条带出现。在诱导表达的6个单菌落中，W16只有一个达到可检测水平（图1 A）。通过对WB反应条带的半定量分析发现，在四个序列中，M16的表达水平最高，和P16相比,Y16的表达水平略高，而在P16诱导表达的6个单菌落中，其中2个的表达水平与M16和Y16表达水平相当，而W16的表达水平明显低于其余序列的表达水平（图1 C）。

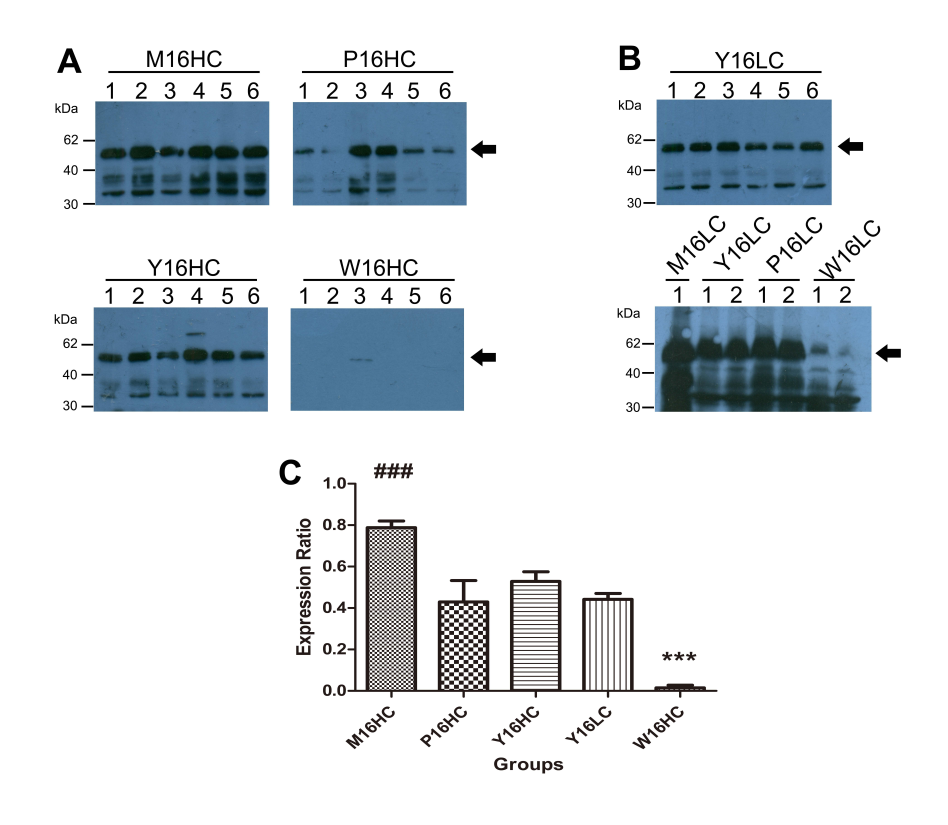


图 1 不同 HPV16L1 基因序列在毕赤酵母中表达的 WB 结果分析

Figure.1 Immunoblotting analyses on expression of different gene versions of HPV16 L1 in *P.pastoris*.

A：Expression of the L1 protein introduced by plasmid pPink HC. B：Expression of the L1 protein introduced by plasmid pPink LC. C：Semi-quantitative analyses of immunoblotting results for the expression of HPV16 L1. Lanes 1-6: different colonies. ### = *p* < *0.001*, compared to P16HC, Y16HC, W16HC and Y16LC; ***= *p* < *0.001*, compared to M16HC, P16HC, Y16HC, and Y16LC.

2.2.2 HPV16L1 基因序列 M16、Y16、P16、W16 在 pPink HC 和 LC 中的表达差异

在异源蛋白优化表达过程中，基因剂量是另一个需要考虑的因素，基因剂量的增加可能会增强 mRNA 的转录水平和丰度。pPink HC 和 pPinkLC 表达载体通过不同启动子强度来控制选择基因 ADE2 的表达，pPink HC 使用弱的启动子，因此只有多拷贝的质粒整合才会使转化质粒在腺嘌呤缺陷培养基中生长。而 pPink LC 则相反，其使用强的启动子，只需一个拷贝的基因整合即可使转化质粒在腺嘌呤缺陷的培养基中生长，因此，通过两种不同的质粒可以达到不同拷贝表达克隆的筛选。M16、Y16、P16、W16 分别克隆于 pPink HC 和 pPinkLC，诱导表达后经 Western blot 检测蛋白表达水平，结果显示，M16、Y16、P16、W16 在 pPink HC 和 pPinkLC 中获得了相似的表达水平（图 1B 和图 1C），Y16 在 pPink HC 和 pPinkLC 中的表达无明显差异（图 1B 和图 1C），所有优化基因序列在 pPinkLC 中获得了有效表达（图 1B），提示基因剂量未对 HPV16 L1 表达产生显著影响。

2.3 HPV16 L1 基因序列 Y16 在不同蛋白酶缺陷株中的表达

Y16HC 重组质粒分别电转化 pPink strain 1、2、3、4， strain 1 为野生型 *ade2* 基因敲除的菌株，其余菌株均从 Strain1 改造而来。Strain2 为 *pep 4* 敲除菌株，为蛋白酶 A 缺陷株，Strain3 为 *prb1* 基因敲除株，导致其蛋白酶 B 合成缺陷，而 Strain4 为蛋白酶 A 和 B 的双敲除株，即 *prb1* 和 *pep* 4 双基因敲除。诱导表达 24hr 后经 western blot 和半定量分析，实验重复三次，结果均一致，代表性结果分别见图 2A 和 2B，结果显示，HPV16L1 基因序列 Y16 在蛋白酶 A 和 B 双缺陷的 strain 4 中获得了最高表达。

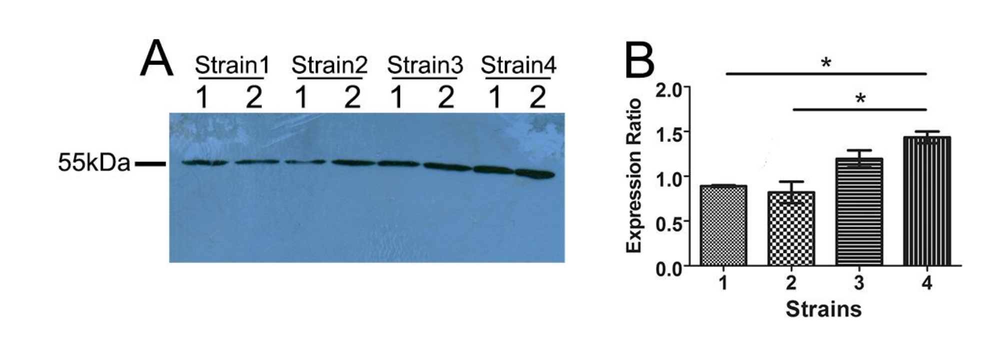


图 2 HPV16 L1（Y16）在 pPink 不同蛋白酶缺陷株中的表达

Fig 2. Expression of HPV16（Y16）in different pPink strains

A: Representative picture for immunoblotting and B: the semi-quantitative analyses for using host strains with different proteinase phenotypes. Lane 1 and 2 represented two different colonies. * = *p* < *0.05*.

2.4 HPV16L1 不同基因序列的密码子分布情况和特征分析

四个来源不同的 HPV16 L1 基因序列 Y16、M16、P16 和 W16 的密码子频率分布统计结果如图 5，它们的最优密码子数分别为 338、266、139 和 252,W16 中含有 5 个频率低于 20%的密码子，而在其他 3 个序列中这一频率的数字为 0。序列的自由能预测、GC 含量和密码子适应指数(codon adaptation index,CAI)见表 2。

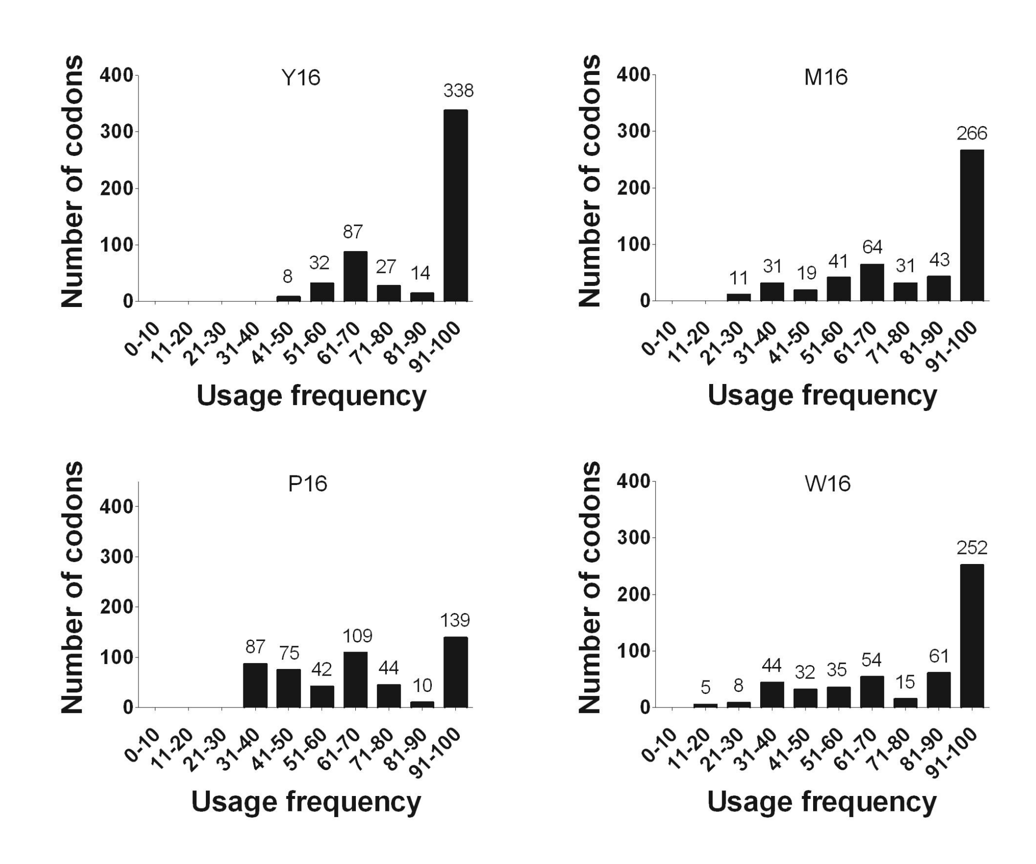


图 3　HPV16 L1 不同基因序列在毕赤酵母中的密码子频率分布情况

Fig 3. Codon frequency distribution of different gene versions of HPV16 L1 for expression in *P. pastoris*.

表 2. 不同 HPV16L1 基因序列特征分析

Table 2. Structure characteristic analyses of mRNA for different versions of HPV16 L1 gene sequences

	Y16	M16	P16	W16
Folding free energy(Kcal/mol)	–451.50	–409.40	–606.50	–384.70
GC%	47.826	43.853	64.097	38.011
CAI	0.87	0.76	0.58	0.73

3 讨　论

遗传密码子的简并性即同一氨基酸对应多个密码子的现象使得同一种蛋白可以由众多的同义基因序列所编码，但这些编码相同氨基酸的不同密码子，在不同物种中使用的频率并非完全地平均分布，绝大多数生物倾向于只利用这些密码子中的一部分，密码子优化方法正是基于其这样的偏爱性。尽管密码子优化策略并不一定总是成功[10, 11]，但它依然是最为广泛使用的提高外源基因表达水平的方法。本研究通过将四个 HPV16L1 基因序列构建 pPinkHC 和 LC 载体，转化 strain

1 以考察 HPV16 L1 蛋白表达水平，结果（图 1A）显示，和其他基因序列相比，M16 显示了最高的表达水平，Y16 显示了比 P16 稍高的表达水平，P16 中有两个单克隆达到了和 M16 相类似的表达水平，而 W16 的表达水平显著低于其他基因序列的表达水平。为了探讨密码子使用频率分布和表达水平之间的关系，对四个 HPV16L1 基因序列的密码子分布频率进行了统计（图 3），结果显示，表达最差的 W16 其密码子分布频率和 M16 及 Y 16 相比，除了有 5 个频率小于 20%的密码子外，其余密码子和 M16 和 Y16 相似。M16 和 Y16 相比，其密码子分布更为均衡，M16 的密码子之中，有 42 个密码子的使用频率在 40%以下，而这一数字在 Y16 为 0；M16 的最优密码子数是 266，而 Y16 为 338，P16 为哺乳动物细胞密码子优化基因序列，与 M16 和 Y16 相比，其拥有最少的最优密码子，W16 的最优密码子数目为 252 个，而 P16 的最优密码子数目为 139 个。 Y16 拥有最多的最优密码子数目，应该获得最高的理论蛋白表达量，但实验结果显示 M16 拥有最高的蛋白表达水平，M16 与 Y16 相比，其拥有较少的最优密码子数目，但其密码子分布更为均衡；P16 为哺乳动物细胞密码子优化的基因序列，在四个基因序列中，其拥有最少的最优密码子数目，但其在毕赤酵母中也获得明显高于 W16 的表达水平。结果显示，在不考虑 mRNA 结构的前提下，优化序列的过程中并没有必要使用那些频率最优的密码子，而避免使用那些极端的稀有密码子可能对提高蛋白的表达水平更为有利。

密码子适应指数（The codon adaptation bias, CAI）是用于对优化的基因序列进行分析的常用指标之一[12]，它用以指示异源基因与目标宿主基因之间最优密码子的接近程度，数值 1 被认为是最佳的理论值。当一个外源基因的密码子与目标宿主偏爱密码子越接近，即 CAI 越接近理论值 1 时，蛋白翻译效率越高，将获得更高的表达水平。在研究中使用的四个 HPV16L1 基因序列中， 拥有最佳 CAI 指数的基因序列其表达并不是最优的，而 CAI 指数较低的 P16 在毕赤酵母却获得了有效表达，提示密码子偏好只是影响表达的一个因素，不能简单的将表达效率高低归结于使用的密码子频率高低，其间因密码子优化而改变的 mRNA 二级结构可能起着重要的影响。然而以 mRNA 二级结构预测指导基因表达优化具有难度，缺乏可靠的理论指导。自由能的预测是对 mRNA 二级结构进行分析时常用的指标，他反映了 mRNA 稳定性特征。有文献报道通过自由能预测基因序列的 mRNA 二级结构从而增加目的蛋白的表达量[13-15]，我们对四个基因序列的自由能进行了预测

测，结果显示，自由能预测的理论数值与实际的蛋白表达水平并不相符，因此不能从简单的自由能高低获得表达效率高低的预判，这期间可能得考虑 mRNA 二级结构的序列分布，蛋白因子的结合等等复杂因素。基因剂量也被认为是影响蛋白表达的关键因素，通过基因重组方法在选择压力下挑选高拷贝的基因重组子，提高 mRNA 的转录水平，有助于提高蛋白的表达量[9]。本研究采用商业化的 pPink™ 表达系统简化重组菌的筛选，pPinkHC 和 pPinkLC 表达载体通过启动子的强弱来控制选择基因 ADE2(Adenine auxotrophy）的表达，pPinkHC 使用弱的启动子，因此只有多拷贝的质粒整合才会使转化质粒在腺嘌呤缺陷培养基中生长，而 pPink LC 则相反。结果显示，不同 HPV16L1 基因序列均在 pPinkLC 中获得了表达，Y16 在 pPinkHC 和 pPinkLC 中的表达无明显差异。鉴于 pPinkHC 理论上保证了高拷贝数的插入，因此推论，基因拷贝数对 HPV16L1 的表达并未产生严重影响。

本研究尝试了不同策略提高 HPV16L1 在毕赤酵母中的表达，包括密码子使用情况，基因拷贝数，蛋白质在宿主中表达时的稳定性。研究结果显示，密码子优化显著提高了 HPV16L1 在毕赤酵母中的表达，蛋白酶缺陷株提高了蛋白的稳定性，从而提高了蛋白的表达。值得注意的是，哺乳动物细胞密码子优化的基因序列 P16 在毕赤酵母中获得了比野生型 W16 更高的表达，即使它拥有比 W16 更少的最优密码子和更多的稀有密码子，提示除了密码子因素外，还需要考虑其他的因素，比如 mRNA 二级结构的改变以及由此导致的对蛋白质功能的影响等，这为后续的研究提供了思考。综上所述，该研究为外源蛋白在毕赤酵母中的优化表达提供了有益的参考。

Impact factors on the expression of recombinant human papillomavirus 16 L1 protein in *Pichia pastoris*

YANG Xu, HUANG Wei-wei ,YAO Yu-feng, LIU Cun-bao, JIN Xiao-mei, SUN Wen-jia ,BAI Hong-mei, XIA Ye, MA Yan-bing

Institute of medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences&Peking Union Medical College, Kunming 650118,Yunnan Province, China

Corresponding author:MA Yan-bing,E-mail:may@imbcams.com.cn

Abstract Optimization approaches have been shown in many published paper to be successful in improving the expression of a heterogenous gene in yeast cells, however, it is always needed to

find out whether and how an approach works for the actual case. In the study, multiple strategies were tried for the efficient expression of HPV16 L1 in *Pichia pastoris,* including the use of four gene versions with distinct sequence features (M16 and Y16 optimized for *Pichia pastoris* cells, P16 for mammalian cells, and W16 from a wild type sequence, respectively), and the employment of plasmid vectors facilitating selection of colonies with high or low gene copy numbers and host strains with different proteinase deficiency. M16 showed the highest expression, followed by Y16 and P16, whereas W16 was merely detectable. However, the codon adaptation order from high to low is sequentially Y16, M16, W16, and P16. The results indicate that the actually effective mechanism of codon optimization might not definitely attribute to codon adaptation. In addition, improving protein stability using specific proteinase-deficient host strains was also proved to be effective for L1 expression. In conclusion, The findings added useful information to our knowledge of optimizing expression of heterogeneous genes in *Pichia pastoris* cells.

Keywords: Expression; recombinant; human papillomavirus type 16 major capsid protein L1 (HPV16 L1); *Pichia pastoris*;

参考文献

[1] Ahmad M, Hirz M, Pichler H, et al. Protein expression in Pichia pastoris: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. Appl Microbiol Biotechnol, 2014, 98(12): 5301-17.

[2] Ciarkowska A, Jakubowska A. Pichia pastoris as an expression system for recombinant protein production. Postepy Biochem, 2013, 59(3): 315-21.

[3] Damasceno L M, Huang C J, Batt C A.， et al. Protein secretion in Pichia pastoris and advances in protein production. Appl Microbiol Biotechnol, 2012, 93(1): 31-9.

[4] Macauley-patrick S, Fazenda M L, Mcneil B, et al. Heterologous protein production using the Pichia pastoris expression system. Yeast, 2005, 22(4): 249-70.

[5] Lanza A M, Curran K A, Rey l G, et al. A condition-specific codon optimization approach for improved heterologous gene expression in Saccharomyces cerevisiae. BMC Syst Biol, 2014, 8(33.

[6] Norkiene M, Gedvilaite A. Influence of codon bias on heterologous production of human papillomavirus type 16 major structural protein L1 in yeast. ScientificWorldJournal, 2012, 2012(979218.

[7] Hanumantha Rao N, Baji babu P, Rajendra L, et al. Expression of codon optimized major capsid protein (L1) of human papillomavirus type 16 and 18 in Pichia pastoris; purification and characterization of the virus-like particles. Vaccine, 2011, 29(43): 7326-34.

[8] Kim H J, Kwag H L. Codon optimization of the human papillomavirus type 58 L1 gene enhances the expression of soluble L1 protein in Saccharomyces cerevisiae. Biotechnol Lett, 2013, 35(3): 413-21.

[9] Shen Q, Wu M, Wang H B, et al. The effect of gene copy number and co-expression of chaperone on production of albumin fusion proteins in Pichia pastoris. Appl Microbiol Biotechnol, 2012, 96(3):

763-72.
[10] Curran K A, Leavitt J M, Karim A S, et al. Metabolic engineering of muconic acid production in Saccharomyces cerevisiae. Metab Eng, 2013, 15(55-66.
[11] Agashe D, Martinez-gomez N C, Drummond D A, et al. Good codons, bad transcript: large reductions in gene expression and fitness arising from synonymous mutations in a key enzyme. Mol Biol Evol, 2013, 30(3): 549-60.
[12] Jansen R, Bussemaker H J, Gerstein M. Revisiting the codon adaptation index from a whole-genome perspective: analyzing the relationship between gene expression and codon occurrence in yeast using a variety of models. Nucleic Acids Res, 2003, 31(8): 2242-51.
[13] Kim H J, Lee S J. Optimizing the secondary structure of human papillomavirus type 16 L1 mRNA enhances L1 protein expression in Saccharomyces cerevisiae. J Biotechnol, 2010, 150(1): 31-6.
[14] Bartoszewski R A, Jablonsky M, Bartoszewska S, et al. A synonymous single nucleotide polymorphism in DeltaF508 CFTR alters the secondary structure of the mRNA and the expression of the mutant protein. J Biol Chem, 2010, 285(37): 28741-8.
[15] Ilyinskii P O, Schmidt T, Lukashev D, et al. Importance of mRNA secondary structural elements for the expression of influenza virus genes. OMICS, 2009, 13(5): 421-30.